

Title	Studies on Protein Biosynthesis with Phenylalanine Incorporation System(Abstract_要旨)
Author(s)	Okamoto, Toshio
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1964-12-22
URL	http://hdl.handle.net/2433/211420
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

氏 名	岡 本 利 雄
学位の種類	お 理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 84 号
学位授与の日付	昭 和 39 年 12 月 22 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Protein Biosynthesis with Phenylalanine Incorporation System (フェニールアラニンとりこみ系によるタン白質生合成の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 正 三 教 授 後 藤 良 造 教 授 杉 野 幸 夫

論 文 内 容 の 要 旨

生体内でのタン白質の合成機構は近年かなり詳細なところまで解明されてきており、素材のアミノ酸は ATP をエネルギー源として、それぞれに特異のリボ核酸(S-RNA) に酵素的に結合して活性化されたのちリボソームに移り、ここで細胞核の DNA からの情報をうけたリボ核酸のメッセンジャー RNA, (m-RNA) およびリボソーム RNA, (r-RNA) をもとにしてアミノアシル基転移酵素の作用で互にペプチド結合してタン白質になるといわれている。しかし、リボソームの構造と機能との関係その他になお十分に解明されていないところが多く一層の研究が要望されている。

著者の主論文は、多くの生物のリボソームの構造にみられる二つの Subunit の機能およびアミノアシル-S-RNA 合成酵素、リボソームへのアミノアシル基転移酵素などの生物種による特異性について研究したものである。

主論文第 1 部では、大腸菌 B(H) 株の対数生長期の菌体から Nirenberg らの方法によってリボソームをとり、これを 0.25 mM の酢酸マグネシウム溶液として放置したのち遠心分離して 30 S と 50 S との Subunit に分離し、これらの Subunit および両者を 5 mM 酢酸マグネシウム溶液として、70 S の顆粒に再生させたものについてタン白質の生合成に際しての挙動をしらべている。これらの顆粒の機能をしらべるに当たっては、おもに、m-RNA の代りに Nirenberg らの方法にしたがつくった P³² ラベルの Polyuridylic acid (Poly-U) を用い、また、とり込まれるアミノ酸としては Poly-U に対応することが知られているフェニールアラニンの C¹⁴ でラベルしたものをを用いた。すなわち、P³²-Poly-U の調製は、P³² リン酸塩を含む培地に培養した大腸菌から放射性 RNA をとり、これを蛇毒の Phosphodiesterase を用いて加水分解してえられた Nucleoside-5'-phosphate の混合物を Dowex-I-ギ酸塩カラムを用いるクロマトグラフィーで分離し、えられた Mononucleoside-5'-phosphate を化学的に Diphosphate にしたのち、これを酵素的に重縮合させて P³²-polynucleotide にかえた。

このようにしてえられた Poly-U と C¹⁴-フェニールアラニン、ATP、GTP、ATP 再生系、Mg⁺⁺ お

よびタン白質生成に関係する酵素類とをリボソームまたはリボソームの Subunit と混じて 37°C に 30 分間放置したのち、顆粒へのフェニールアラニンのとり込みをしらべると、もとのリボソームと 30 S および 50 S Subunit を 1:2 の比で混じて再生させたものとはとり込みが認められたが、30 S または 50 S Subunit をそれぞれ単独に用いた場合にはとり込みがおこらなかった。また、一定量のリボソームと種々の量の P^{32} -Poly-U とを異なる濃度の酢酸マグネシウムを含む緩衝液に加え、25,000 rpm, 3 時間の遠心沈殿を行なったのち沈降した顆粒の放射能と紫外線吸収とを測定して P^{32} -Poly-U と顆粒との結合の有無をしらべたところ、酢酸マグネシウムが 5 mM のときには 1 分子の Poly-U に数個の 30 S Subunit が結合することが判明した。しかし、50 S の Subunit は、どの条件下でも Poly-U と結合せず、また、Poly-U の代りに Polyadenylic acid や Polycytidylic acid を用いた場合には 5 mM 酢酸マグネシウム溶液でもいずれの Subunit と結合がおこらないことがわかった。また、30 S Subunit と結合した Poly-U は酢酸マグネシウム濃度を 0.25 mM とすると、再び解離する。

大腸菌の r-RNA はそのままでは Poly-U のように 30 S Subunit には結合しないが、ホルムアルデヒドと 20 時間 37°C に放置したものをを用いると、Poly-U と同様に結合するようになる。この事実は Polynucleotide とリボソームとの結合には前者の二次構造が破壊されていることが必要であることを示唆するものである。この推定は、100°C, 2 分間の加熱処理した r-RNA や、Midgley らの方法で調製した大腸菌の T_2 フェージ感染細胞の“Pulse” RNA (T_2 m-RNA) を用いた実験結果からも支持された。また、あらかじめ熱やホルマリンまたは亜硝酸で処理した大腸菌の DNA もリボソームと結合することが判明した。また、リボソームをスイ臓の Ribonuclease である程度破壊しておいても DNA は結合するが、トリプシン処理したものには結合がおこらなくなる。これらの事実は Polynucleotide とリボソームとの結合には、前者が二重らせん構造をもたないことと、リボソームの表面構造に関するタン白質の状態が前者の化学構造よりも重要な因子となることを示すものである。

以上の事実ならびに 50 S Subunit に S-RNA が結合するという最近の Gilbert の発見や S-RNA の長さや 30 S, 50 S Subunit の中心間の距離の一致などの点を考慮して、著者はリボソームの 30 S Subunit に結合した一重鎖構造をもつ m-RNA をもとに、50 S のところでペプチド合成がおこるとして活性リボソームの構造と機能との関係を説明している。

主論文第 2 部はタン白質の生合成における アミノアシル-S-RNA とこれの合成酵素およびアミノアシル基のリボソームへの移転酵素などの生物の種による特異性に関する研究である。大腸菌と酵母とを試料として DEAE セルロースやメチルアルブミン-ケイ藻土を用いるカラムクロマトグラフィーによってフェニールアラニンに対応する S-RNA, フェニールアラニール-S-RNA 合成酵素およびフェニールアラニール基のリボソームへの移転酵素を精製し、これらを用いて Poly-U の存在の下に大腸菌のリボソーム上でのタン白質へのアミノ酸のとり込みをしらべた結果、これらの微生物の間にはフェニールアラニール-S-RNA 合成酵素には種特異性は認められたが、リボソームへのフェニールアラニール基移転においては両者のフェニールアラニール-S-RNA を互に交換して用いても活性に差異がみとめられなかった。このことから著者は二つの微生物の間ではフェニールアラニンに関する Code は共通であるとしている。

(参考論文の要旨)

その1は、鼠肝のタン白質合成系におけるアミノアシル-S-RNA からリボソームへのアミノアシル基の移転酵素を精製してその特性をしらべたものである。この酵素の作用には GTP の共働が必要であり、また、精製によって安定性が高まることが認められている。

その2とその3とは、酵母の S-RNA をイオン交換クロマトグラフィーで分別する方法の研究に関するものである。DEAE セルロース およびメチル化アルブミンなどのカラムを用いることにより各アミノ酸に特異的な S-RNA の部分的分別が可能であり、特に DEAE セルロースや DEAE セフデックスのカラムはバリンに特異の S-RNA 分離に、また、メチル化アルブミンカラムはグリシンおよびフェニールアラニンに対応する S-RNA の分離に好結果をえている。

論文審査の結果の要旨

生体細胞におけるタン白質の合成機構はかなり詳細なところまで明らかにされてきており、細胞質中のリボ核酸 (S-RNA) と結合して活性化されたアミノ酸は、細胞核のデオキシリボ核酸 (DNA) の情報をうけて生成したメッセンジャー RNA (m-RNA) をもとにしてリボソーム上で互に酵素的に結合して DNA の情報に対応するアミノ酸配列をもつタン白質がつくられることが確証されている。しかし、機構の詳細な点にはなお解明されていないものが多く残されている。著者の学位論文は、タン白質の生合成に際して、多くの生物のリボソームの構造にみられる軽・重2種の Subunit の機能を明らかにし、また、タン白質の生合成に関係する酵素やリボソームの生物の種による特異性について詳細に研究したものである。

大腸菌 B(H) 株の菌体磨砕液からとったリボソームは、0.25 mM 酢酸マグネシウムで処理して遠心分離すると 30 S(1) と 50 S(2) の Subunit に別かれる。(1) と (2) は 5 mM 酢酸マグネシウム溶液中では再び結合して 70 S の顆粒 (3) になる。もとのリボソーム (4) および (1), (2), (3) のそれぞれを用いて、m-RNA の代りに Polyuridylic acid (Poly-U), アミノ酸として C¹⁴-フェニールアラニンを用いる生合成系で Polyphenylalanine の生成を追跡する方法で Subunit の機能をしらべると、(1) および (2) はそれぞれ単独では全く生成がおこらず (3) は (4) の70%の活性を示すことがわかった。また、Poly-U は 30 S の Subunit と結合するが、50 S の Subunit とは結合しない。大腸菌からえたリボソーム-RNA はそのままでは Poly-U のように 30 S Subunit には結合しないが、あらかじめ熱処理かホルマリン処理しておくとは結合するようになる。このことは、二重鎖構造をもつ核酸はリボソームとは結合できぬことを示すものであり、さらに、大腸菌の T₂ フェージの Pulse RNA やあらかじめ二重らせん構造を破壊した DNA を用いた実験でこれを確証している。すなわち、これらの結果からタン白質の生合成に際して、m-RNA は一重鎖構造をとってリボソームの 30 S Subunit に結合し、これをもとにして 50 S Subunit に結合したアミノアシル-S-RNA のアミノアシル基が互にペプチド結合してタン白質がつくられることが判明した。

また、大腸菌と酵母とからフェニールアラニール-S-RNA 合成酵素およびリボソームへのアミノアシル基の移転酵素をとり出して Poly-U を用いる Polyphenylalanine 合成系を利用してこれら諸成分の生物の種による特異性をしらべ、フェニールアラニール-S-RNA 合成酵素は種特異性を示すが、リボソームへのフェニールアラニル基の移転はフェニールアラニール-S-RNA を他の種のものと交換しても同様に進行す

ることを確かめた。このことはフェニールアラニンに関する Code はこの2種の微生物には共通であることを示すものである。これらの研究結果はタンパク質合成機構の未解明部をうづめる貴重な知見であり高く評価することができる。

また、参考論文3編は、アミノアシル-S-RNA からリボソームへのアミノアシル基移転酵素の精製とアミノ酸に特異的な S-RNA の分別法に関するものであり、いずれも価値ある研究である。

以上のように、著者岡本利雄の学位論文はタンパク質合成機構の解明に寄与し、生化学のこの分野での発展に貢献するところが大である。また、主論文、参考論文を通じ、著者は優れた研究能力をもっていることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。